

TRizol® LS Reagent

カタログ番号	Quantity	室温保存
10296-010	100 mL	
10296-028	200 mL	

概要

TRizol® LS 試薬 は、ヒト、動物、植物、酵母、細菌由来の液体サンプルから 1 時間以内で高品質の RNA(および DNA または蛋白質)を抽出する Ready-To-Use の試薬です。TRizol® LS 試薬は、低分子から高分子の RNA 分子を効率良く抽出するためのフェノールおよびグアニジニソチアシアネートなどを含む 1 層の溶液です。TRizol® LS 試薬は、細胞ホモジナイズのステップにおいて、効率的に細胞を溶解し、RNase 活性を抑え、損傷のない RNA の抽出を可能にします。TRizol® LS 試薬 は多量のサンプルを同時に処理できる試薬で、Chomczynski および Sacchi によって開発されたシングルステップ RNA 単離法(Chomczynski & Sacchi, 1987)の改良版です。

TRizol® LS 試薬 は 1 つのサンプルから RNA、DNA およびタンパク質を抽出することができます(Chomczynski, 1993)。TRizol® LS 試薬をサンプルに加えてホモジナイズした後、クロロホルムを加えます。遠心で層分離した後、RNA を含む水相と DNA および蛋白質を含む中間相およびフェノール-クロロホルム相に分離されます。水相の RNA に Isopropanol を加えて沈殿させて回収します。中間相およびフェノール-クロロホルム相の DNA はエタノールにより沈殿させ回収します。タンパク質はフェノール-エタノールの上清をイソプロパノール沈殿することにより回収します。沈殿した RNA、DNA およびタンパク質は不純物を取り除くための Washing を行い、再懸濁し、ダウンストリームのアプリケーションに使用します。

- 抽出した RNA は RT-PCR、ノーザンブロッティング、Dot Blot hybridization、poly(A)+ selection、in vitro トランスレーション、RNase protection assay およびクローニングに使用することができます。
- 抽出した DNA は PCR、制限酵素処理およびサザンブロッティングに使用することができます。
- 抽出した タンパク質は、ウェスタンブロッティング、酵素活性のリカバリー (タンパク質による)、免疫沈降 (タンパク質による) に使用できます。

重要点 : TRizol® LS 試薬は液体サンプル (例 : 血液、ウイルス溶液) のための試薬です。TRizol® 試薬と TRizol® LS 試薬の違いは成分の濃度だけになります。TRizol® LS 試薬はサンプルに添加する試薬量を減らすために濃縮されております。

TRizol® LS 試薬を希釈せずに固体のサンプルに使用しないでください。 TRizol® LS 試薬を固体のサンプルに使用すると、TRizol® 試薬を使用した時よりも RNA の収量が減少します。

注意点

TRizol® LS 試薬 はフェノール (有毒、腐食性) とグアニジニソチアシアネート (刺激性)が含まれております。これらの成分は適切に扱わない場合、健康に被害を及ぼす可能性があります。扱う時は、ドラフト内で、手袋および眼の保護具 (安全ゴーグル) を装着してご使用ください。適切な取り扱いと廃棄のガイドラインに関してはお客様の施設 Environmental Health and Safety (EH&S) のご担当者にお問い合わせください。TRizol® LS 試薬への直接の接触は避けてください。皮膚または眼への接触、吸い込みにより化学火傷を引き起こす恐れがあります。万が一皮膚や眼に接触した場合には、ただちに患部を大量の水で 15 分間洗浄し、必要があれば医師の診察を受けてください。もし気化ガスを吸いこんでしまった場合には、ただちに新鮮な空気が得られる場所に移動し、必要があれば医師の診断を受けてください。更なる情報につきましては、www.invitrogen.com/sds より入手可能な SDS (Safety Data Sheet)をご参照ください。

製品サイズと保存温度

TRizol® LS 試薬 は 100 mL (Cat. no. 10296-010)のものと 200 mL (Cat. no. 10296-028)のサイズの者があり、室温で出荷されます。製品がお手元に届きましたら、室温で保存してください。本製品は 12 カ月安定です。

用途

本製品は研究用となります。ヒトまたは動物への診断、治療にはご使用できません。

必要な試薬

RNA、DNA、タンパク質抽出には下記の器具および試薬が必要となります。

RNA Isolation	DNA Isolation	Protein Isolation
- Chloroform - Isopropyl alcohol 75% ethanol (in DEPC-treated water) - RNase-free water or 0.5% SDS - Centrifuge and rotor capable of reaching up to 12,000 × g - Polypropylene microcentrifuge tubes - Water bath or heat block (55–60°C)	- Chloroform 100% ethanol 75% ethanol 0.1 M sodium citrate in 10% ethanol 8 mM NaOH - Centrifuge and rotor capable of reaching up to 12,000 × g - Polypropylene microcentrifuge tubes	- Chloroform - Isopropyl alcohol 100% ethanol 0.3 M Guanidine hydrochloride in 95% ethanol 1% SDS - Centrifuge and rotor capable of reaching up to 12,000 × g - Polypropylene microcentrifuge tubes

サンプル調整

1. サンプルのタイプを選び、下記の表をもとに室温でサンプルをホモジナイズします。サンプル量と **TRIzol® LS 試薬のボリュームの割合は必ず 1 : 3 にしてください**。TRIzol® LS 試薬の量が不十分な場合、DNA がコンタミネーションする可能性がありますのでご注意ください。
- Note**;少量のサンプル(0.25ml 以下)から抽出する場合は、RNase free 水で 0.25ml にメスアップしてください。

サンプルタイプ	アクション
生体液	1. 0.25ml のサンプル量あたり 0.75ml の TRIzol® LS 試薬を加えてください。 2. 何度か上下にピペッティングを行い、細胞を溶解して下さい。 Note : 血液のように多くの物質が混入しているサンプルについては、サンプルと同量の RNase Free Water を加えてサンプルを希釈してください。
組織	1. 50-100 mg 組織または 0.25ml の細胞あたり 0.75mL TRIzol® LS 試薬を加えてください。 2. glass-Teflon® または power homogenizer を使用してサンプルをホモジナイズしてください。 Note : 組織回収後は、速やかに上記のホモジナイズを行うか、凍結します。希釈せずに固体のサンプルには使用しないでください。
接着細胞 (単層)	1. 培地を dish から取り除く。 2. 10 cm2 dish 表面積に対して 0.3-0.4mL の TRIzol® LS 試薬 を直接細胞に加えます。 3. 数回上下にピペッティングし、直接細胞を溶解します。 Note : Culture Dish またはホモジナイズ溶液には絶対に水を加えないでください。Dish と細胞に残っているわずかな培地でホモジナイズ溶液は十分に希釈することができます。
浮遊細胞	1. 遠心で細胞を回収し、培地を取り除きます。 2. 0.25 mL のサンプル (動物、植物、酵母由来の場合は 5-10 × 10 ⁶ 、細菌由来の場合には 1 × 10 ⁷ cells) に対して 0.75 mL の TRIzol® LS 試薬を加えます。 Note : TRIzol® LS 試薬添加前の細胞洗浄は、mRNA が分解される可能性があるため避けてください。 3. 数回上下にピペッティングし、細胞を溶解します。一部の酵母および細菌の破碎には、ホモジナイザーが必要な場合があります。

2. (Option) 筋肉、脂肪組織または植物の塊茎部のような、タンパク質、脂肪、多糖類または細胞外物質を大量に含むサンプルは、さらに分離ステップが必要な場合があります。
- Note**: RNA 分離後に DNA も分離するサンプルにはこの追加ステップは行わないでください。

サンプルのホモジナイズ

サンプルタイプ	Note
タンパク質、脂肪、多糖類または細胞外物質を大量に含む組織または細胞	1. ホモジナイズ後、12000g, 10 分間、4℃で遠心します。 Note : 細胞外膜、多糖類および高分子量の DNA は沈澱し、RNA は上清に含まれています。脂肪組織からの検体は、上層に脂肪成分がみられることがあります 2. 脂肪成分の相を取り除きます。 3. 透明な上清を新しいチューブに移します。

3. 2 相分離ステップに移るか、ホモジナイズサンプルを保存してください。ホモジナイズサンプルは室温で数時間、-60 °C から -70°C で少なくとも 1 年は安定です。

2 相分離

1. ホモジナイズサンプル (サンプルのホモジナイズの項目をご参照下さい) の核タンパク複合体を完全に分解させるため、室温で 5 分間インキュベーションします。
2. 0.75mL の TRIzol® LS 試薬に対しての 0.2 mL のクロロホルムを加えます。しっかりと蓋を閉めます。
3. チューブを 15 秒間、激しく振ります。
4. 室温で 2 分から 15 分間インキュベーションします。
5. 12,000g、15 分間、4℃で遠心を行います。
Note: 遠心後の溶液は暗赤色のフェノール-クロロホルム相、中間相および無色の水相に分離します。RNA は水相に溶解しています。得られる水相のボリュームは、使用した TRIzol® LS 試薬の約~70%になります。
6. チューブを 45 度に傾け、注意深く水相を回収します。水相をピペットで吸い込む際には、中間相およびフェノール-クロロホルム相を吸いこまないよう十分に注意します。
7. 水相を新しいチューブに移し、RNA の抽出のステップに進みます。
8. その後、DNA、タンパク抽出を行う際には、中間相、フェノール-クロロホルム相を保存しておきます。具体的プロトコールについては **DNA の抽出およびタンパク質の抽出**の項をご参照ください。フェノール-クロロホルム相の安定性については、4℃で一晩安定です。

RNA の抽出方法

RNA の調整、取り扱いの際には、RNase が混入しないような措置を行ってください。

RNA の沈殿

1. (Option)少量のサンプル (<10⁶ 細胞または <10 mg 組織) から RNA を抽出する場合は、回収した水相に 5 μg から 10 μg の RNase-free のグリコーゲンをキャリアとして加えます。
Note: グリコーゲンは RNA と共沈します。グリコーゲンは最高 4mg/ml の濃度まで加えても、1 本鎖 cDNA 合成や PCR 反応を阻害することはありません。
2. 回収した水相にイソプロパノールを加えます。使用した TRIzol® LS 試薬 0.75mL につき 0.5mL の 100%イソプロパノール加えます。
3. 室温で 10 分間インキュベーションを行います。
4. 12000g、10 分間、4℃で遠心を行います。
Note: 遠心前には RNA は眼には見えないことが良くありますが、チューブの側面や底部にゲル状のペレットとして確認できます。
5. RNA の洗浄と溶解に進みます。

RNA の洗浄と溶解

- 1. 上清をチューブから取り除きます。
- 2. 使用した TRIzol® LS 試薬 0.75mL につき 1mL の 75%エタノールで RNA のペレットを洗浄します。
- 3. ボルテックス処理をして、4℃で 5 分間、 7500 g で軽く遠心をして、上清を捨てます。
- 4. RNA ペレットを 5 分から 10 分間 風乾または真空乾燥してください。真空乾燥時は遠心しないでください。
Note: RNA のペレットは、完全に乾燥させると溶解度が極端に低下するため、完全に乾燥する前に溶解してください。A260/280 比<1.6 の場合は、RNA が完全に溶解していない可能性が考えられます
- 5. RNA に RNase free の水または 0.5% SDS 溶液 (20 μl から 50 μL)を加え、何度かピペティングを行い混合します。
Note: 回収した RNA を、その後の実験で酵素反応に使用する場合は、0.5%SDS 溶液を用いないでください。
- 6. 恒温槽かヒートブロックで 55℃から 60℃で 10 分から 15 分間インキュベーションします。
- 7. 次の実験へ進むか、-70℃に保存します。

DNA の抽出方法

RNA の抽出方法に記載されているように水相の除去後、中間相およびフェノール-クロロホルム相より DNA を抽出することができます。

DNA の沈殿

- 1. 中間相の上に残っている水相を除去します。水相を注意深く除去することが、DNA の精製度に重要です。
- 2. 使用した TRIzol® LS 試薬 0.75ml につき 100%エタノール 0.3ml を加えます。
- 3. チューブに蓋をして転倒混和にてサンプルを混合してください。
- 4. 室温で 2-3 分インキュベーションします。
- 5. 4℃で 5 分間、2000g で遠心し、DNA をペレットにします。
- 6. もしタンパク質の抽出も行う場合には、フェノール-エタノールの上清を取り除き新しいチューブに移して保存しておきます。上清は-70℃で数カ月間は安定です。
- 7. DNA の洗浄と溶解に進みます。

DNA の洗浄と溶解

- 1. クエン酸ナトリウム/エタノール溶液 (0.1M クエン酸ナトリウム.pH8.5 を 10%エタノールに加える) で DNA ペレットを洗浄します。使用した TRIzol® LS 試薬 0.75ml あたり 1ml の溶液で洗浄します。
- 2. 室温で 30 分間、インキュベーションします。インキュベーション中は時々チューブを攪拌してください。
Note: DNA はクエン酸ナトリウム/エタノール溶液内で少なくとも 2 時間は保存できます。
- 3. 4℃で 5 分間、2000g で遠心を行い、上清を捨てます。
- 4. 上記の操作 (ステップ 1-3) をもう 1 回繰り返します。
Note: DNA のペレットが大きい場合 (>200 μg)には上記の操作を 2 回繰り返します。
- 5. 使用した TRIzol® LS 試薬 0.75mL につき 1.5ml から 2mL の 75%エタノールを加えます。
Note: DNA サンプルは 75%エタノール中で保存でき、

- 4℃で数カ月安定です。
- 6. 10 分から 20 分インキュベーションします。インキュベーション中は時々チューブを攪拌してください。
- 7. 4℃で 5 分間、2000g で遠心を行い、上清を捨てます。
- 8. DNA ペレットを 5 分から 10 分間、風乾または真空乾燥してください。真空乾燥時は遠心しないでください。
- 9. DNA 濃度が 0.2 から 0.3 μg/μl になるように、8mM NaOH 溶液に溶解してください。10⁷ 個の細胞、または 50~70mg の組織から抽出した DNA に 300 から 600μl の 8mM NaOH 溶液を加えます。
Note: 抽出された DNA は、水あるいは Tris バッファーでは再懸濁が難しいため、弱アルカリ性のバッファーで再懸濁することを推奨します。
- 10. 4℃、12000g で 10 分間遠心し、不溶性物質を除去してください。
- 11. 新しいチューブに DNA を含む上清を移してください。ダウンストリームのアプリケーションによっては HEPES で溶液の pH を調整する必要があります。DNA は 4℃で一晩安定です。長期間保存する際には、HEPES にて溶液の pH を 7-8 程度に調整して 1mM の EDTA を加えたのち、4℃または-20℃で保存してください。

RNA 及び DNA の収量の測定

RNA、DNA の濃度を測定するには 260nm、280nm の吸光度の測定にて RNA、DNA の濃度が測定できます。

予想される収量

下記の Table には様々な出発材料から抽出される RNA (A260/280 の値が 1.8 以上) 及び DNA (A260/280 の値が 1.6~1.8)の一般的な収量を示しています。

出発材料	量	RNA	DNA
ヒト血液	250ul 1ml	2.6-4.0ug 15-20ug	—
上皮細胞	1×10 ⁶ cells	8-15 μg	—
タバコ葉	—	73ug	—
ヒト白血球	7×10 ⁷ cells 7×10 ⁸ cells	60-70ug 1109ug	— 1.3mg
培養細胞 (哺乳類)	1×10 ⁶		5~7 μg
骨格筋、脳	1 mg	1~1.5 μg	2~3 μg
胎盤	1 mg	1~4 μg	2~3 μg
肝臓		6~10 μg	3~4 μg
腎臓	1 mg	3~4 μg	3~4 μg

タンパク質の抽出方法

タンパク質は DNA の沈殿後のフェノール-エタノールの上清からタンパク質を抽出します。タンパク質の沈殿またはタンパク質の透析によりタンパク質を抽出できます。

タンパク質の沈殿

- 1. 使用した TRIzol® LS 試薬 1mL につき 1.5mL のイソプロパノールをフェノール-エタノール上清に加えます。
- 2. サンプルを室温で 10 分間、インキュベーションします。
- 3. タンパク質をペレットにするため 4℃で 10 分間、12,000g で遠心し、上清を捨てます。
- 4. タンパク質の洗浄ステップに進みます。

タンパク質の洗浄

- 95%エタノールに 0.3M グアニジン塩酸を溶かした Wash 溶液を調整します。
- 使用した TRIzol® LS 試薬 1mL に対して 2ml の Wash 溶液を使用してタンパク質ペレットを洗浄します。
- 室温で 20 分インキュベーションします。**Note:** タンパク質サンプルは Wash 溶液中で保存でき、4°Cで少なくとも 1 カ月、-20°Cで少なくとも 1 年間は安定です。
- 4°Cで 5 分間、7,500g で遠心し、上清を捨てます。
- 2-4 のステップを 2 回かそれ以上の回数繰り返します。
- 2mL の 100%エタノールをタンパク質ペレットへ添加。
- 室温で 20 分間インキュベーションします。
- 4°Cで 5 分間、7,500g で遠心し、上清のエタノールを除去します。
- タンパク質ペレットを 5 分から 10 分間、風乾させます。ペレットを完全に乾燥させないようにしてください。
- タンパク質の溶解のステップに進みます。

タンパク質の溶解

- 200 µL の 1% SDS 溶液をタンパク質ペレットに加えて、溶解するまでピペティングします。
Note: ペレットを完全に溶解するため、50°Cの恒温槽またはヒートブロックで温めることも必要があればお勧めします。
- 4°Cで 10 分間、10,000g で遠心し、不溶解物質を取り除きます。
- タンパク質が含まれる上清を新しいチューブに移し、ダウンストリームのアプリケーションにご使用ください。

または-20°Cで保存することもできます。

タンパク質の透析法

- フェノール-エタノール上清を透析膜に入れます。
Note: 透析膜の種類によってはフェノール-エタノールに溶解してしまうものもあります (例: Cellulose Ester)。使用する前に透析膜がフェノール-エタノール溶液に使用できるかお試しください。
- 4°Cで、0.1%SDS 溶液中で 3 回バッファー交換を行い、サンプルを透析します。16 時間後に初めのバッファー交換を行い、更に 4 時間後 (初めより 20 時間後) にまたバッファー交換を行います。更に 2 時間後 (初めより 22 時間後) に最後のバッファー交換を行います。
Note: 0.1% SDS はタンパク質ペレットの溶解に使用されます。低い濃度の SDS では不十分です。必要であれば溶解後に SDS を希釈します。
- 4°Cで 10 分間、10,000g で透析液を遠心します。タンパク質は透明な上清となります。
- 上清を新しいチューブに移し、ダウンストリームのアプリケーションに進むか、-20°Cに保存してください。
- (Option) ペレットを 100 µL の 1% SDS 溶液または 100 µL の 8M urea 溶液に必要な濃度で溶解して下さい。

タンパク質の収量の測定

タンパク質の濃度は Bradford アッセイで測定下さい (SDS の濃度は<0.1%である必要があります)

トラブルシューティング

問題	原因	対処
RNA、DNA、タンパク質の収量が低い	- サンプルの溶解及びホモジナイズが不十分 - RNA、DNA、タンパク質の最終ペレットの溶解が不十分。	- 出発材料の量を減らしてください。組織を更小さく刻み TRIzol® LS 試薬に完全に浸っていることをご確認ください。 - 溶解を促進する為、サンプルのピペティングを繰り返し行い、50-60°Cでサンプルを温めてください。
RNA、DNA、タンパク質が分解している	- サンプル採取後、すぐにサンプルを処理していない、または凍結していない。 - RNA、DNA、タンパク質を適切な温度に保存していない。	- サンプルは採取後、必ずすぐに処理または凍結させてください。 - RNA サンプルは-60°Cから-70°Cに保存してください。DNA、タンパク質の場合には-20°Cに保存して下さい。
RNA、DNA のコンタミネーションがある	- 中間相、フェノール-クロロホルム相を水相をといっしょにピペットで吸い込んでしまっている - 水相の除去が不十分である 0.1M クエン酸ナトリウム/エタノール溶液での DNA ペレットの洗浄が不十分	2 相分離後の水相の回収時に中間相、フェノール-クロロホルム相をピペットで吸い込まないように、水相に余裕を残して回収を行ってください。 - DNA 沈殿前に水相の除去を行ってください。 0.1M クエン酸ナトリウム/エタノール溶液でペレットを洗浄していることを確認してください。
RNA の A260/280 値が低い	- サンプルのホモジナイズに使用した TRIzol® LS 試薬の量が不十分である。 - フェノール-クロロホルム相の除去が不十分。	- サンプルに合った適切な量の TRIzol® LS 試薬を加えて下さい。詳しくはサンプルのホモジナイズの項をご参考ください。 2 相分離後の水相の回収時に中間相、フェノール-クロロホルム相をピペットで吸い込まないように、水相に余裕を残して回収を行ってください。
DNA の A260/280 値が低い	DNA の調整時のフェノールの除去が十分でない。	DNA ペレットを 0.1M クエン酸ナトリウム/エタノール溶液での洗浄時の洗浄回数を増やしてください。

References:

Chomczynski, P. (1993) A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *BioTechniques* 15, 532-537.
Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987) Single Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156-159.
Hummon, A. B., Lim S. R., Difiilippantonio, M. J., Ried, T. (2007) Isolation and solubilization of proteins after TRIzol extraction of RNA and DNA from patient material following prolonged storage. *BioTechniques* 42, 467-472.
Limited Use Label License No. 358: Research Use Only: The purchase of this product conveys to the purchaser the limited, non-transferable right to use the purchased amount of the product only to perform internal research for the sole benefit of the purchaser. No right to resell this product or any of its components is conveyed expressly, by implication, or by estoppel. This product is for internal research purposes only and is not for use in commercial services of any kind, including, without limitation, reporting the results of purchaser's activities for a fee or other form of consideration. For information on obtaining additional rights, please contact outlicensing@lifetech.com or Out Licensing, Life Technologies, 5791 Van Allen Way, Carlsbad, California 92008.
©2010 Life Technologies Corporation. All rights reserved. The trademarks mentioned herein are the property of Life Technologies Corporation or their respective owners.
TRIzol® is a registered trademark of Molecular Research Center, Inc.